

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med., Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c.
Dr. med. h. c. Hans Freiherr v. K r e ß

Beitrag zum Nachweis überstandener
Streptokokken-Infektionen
durch M-Protein-Injektionen aus
Streptokokken der Gruppe A

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rotraut Kirschling geb. Maassen

aus Jena

1967

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER FREIEN UNIVERSITÄT
BERLIN IM STÄDTISCHEN KRANKENHAUS WESTEND

Direktor: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. K r e ß

BEITRAG ZUM NACHWEIS ÜBERSTANDENER STREPTOKOKKEN-
INFEKTIONEN DURCH M-PROTEIN-INJEKTIONEN AUS
STREPTOKOKKEN DER GRUPPE A

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

AN DER

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von

Rotraut Kirschling geb. Maassen

aus Jena

DEKAN: Professor Dr.med. Alfred N. W i t t
REFERENT: Priv.Doiz. Dr.med. Meta A l e x a n d e r
KORREFERENT: Professor Dr.med. Bernh. S c h m i d t



Promotionsdatum: 17.7.1967

In Dankbarkeit gewidmet
meinem Vater



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0104

I. Diskussion der herkömmlichen serologischen Methoden zum Nachweis einer akuten oder überstandenen Streptokokkeninfektion	1
A. ASR	1
B. CrP	3
II. Theoretische Grundlagen einer neuen Methode zum Nachweis einer akuten oder überstandenen Streptokokkeninfektion	4
III. Herstellung des Impfstoffes	6
A. Originalmethode nach Stollerman, Siegel und Johnson	6
B. Eigene Methode	8
IV. Durchführung der Impfungen	15
A. Nach der Literatur	15
1. Hautteste und Reaktionen nach kleinsten intrakutanen und größeren subkutanen Stickstoffgaben	15
2. Vollständig durchgeführte Immunisierung	16
3. Methoden zum Nachweis von Antikörpern im Blut	16
4. Ergebnisse	22
B. Eigene Untersuchungen	25
1. Vorversuche, ASR- und Objektträgeragglutination vor der Impfung	26
2. Ergebnisse der Vorversuche	27
3. Hauptversuche	27
a) Erste Infektion mit virulenten Streptokokken und Verfahren zum Auszählen von Streptokokken	27
b) Zweite bis neunte Infektion	29
c) Erste Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken	30

d) Zweite Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken	30
e) Dritte Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken und einer Wartezeit von 4 Wochen	32
f) Erste Impfung und darauffolgende Antikörperbestimmung	33
g) Zweite Impfung und darauffolgende Antikörperbestimmung	35
h) Weitere Impfungen, auch der nicht infizierten Versuchstiere	36
V. Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse	38
VI. Zusammenfassung der Arbeit	40
VII. Literaturverzeichnis	42
VIII. Anhang, Tabellen und Bilder	47

I. Diskussion der herkömmlichen serologischen Methoden zum Nachweis einer akuten oder überstandenen Streptokokkeninfektion.

Die in der Klinik gebräuchlichste Methode, um eine akute oder überstandene Streptokokkeninfektion nachzuweisen, ist die Antistreptolysinreaktion. Daneben spielt die Bestimmung des C-reaktiven Proteins eine gewisse Rolle in der serologischen Diagnostik des akuten rheumatischen Fiebers. Diese beiden Methoden haben sich aber in der Praxis als unzulänglich erwiesen.

A. ASR

Nach TODD bilden die haemolysierenden Streptokokken der Gruppe A in serumfreier Bouillon zwei verschiedene Lysine:

1. Das sauerstofflabile O-Streptolysin
2. Das sauerstoffstabile S-Streptolysin

Überimpft man diese serumfreien Lysine z.B. einem Kaninchen, so antwortet dieses nach einer Latenzzeit von ca. drei Wochen mit einer Antikörperbildung, die sich gegen das Antigen Streptolysin richtet. Es werden somit entsprechend

1. O-Antistreptolysin und
2. S-Antistreptolysin

gebildet. Wir haben es dabei eindeutig mit einer Antigen - Antikörperreaktion (AAR) zu tun, einem Versuch, das schädigende Agens zu neutralisieren. Damit gelang TODD 1932 erstmalig der Nachweis eines Zusammenhanges zwischen Streptokokkeninfektion und Streptolysin-Antigen. Durch Messung des Antikörpertiters gegen Streptolysin (Antistreptolysintiter) kann so ein Streptokokkeninfekt serologisch aufgedeckt werden.

Weiter wurde ein sicherer Zusammenhang zwischen Infekten mit β -haemolysierenden Streptokokken der Gruppe A und akutem rheumatischem Fieber festgestellt (CANTANZARO und Mitarbeiter, SWIFT, SWIFT und HODGE, ROTHBARD und Mitarbeiter).

"Der Zusammenhang zwischen Streptokokkeninfektion und Rheumatismus ist jedoch nicht einfach kausal, sondern wird durch das Einsetzen immunbiologischer Reaktionen kompliziert" (NEUHAUS). Ein erhöhter ASR-Titer wird allgemein nach akuten Streptokokkeninfektionen gefunden (62% bis 75%) (ALEXANDER, COBORN und PAULI, OKER-BLOM, GALTS), auch wenn diese nicht von einer rheumatischen Erkrankung gefolgt sind (SASLAW und STREIT-FELD).

Die den Rheumatismus begleitenden Veränderungen sind auf zwei Dinge zurückzuführen:

1. Auf den Streptokokkeninfekt antwortet der Organismus mit einem rheumaunspezifischen Antikörper (ASR-O)
2. Die rheumatischen Gewebsveränderungen sind Ausdruck einer allergisch-hyperergischen Entzündung (NEUHAUS).

Das akute rheumatische Fieber wird immer von einem Streptokokkeninfekt eingeleitet. Daher ist der ASR-Titer im allgemeinen hoch, er begleitet "rheumaunspezifisch" das rheumatische Krankheitsbild (NEUHAUS).

Ein latenter, subklinischer Rheumatismus, der hauptsächlich durch immunbiologische Vorgänge charakterisiert wird, zeigt häufig keine ASR-Erhöhung. Umgekehrt zeigt beim Rheumatiker ein erhöhter ASR-Wert nicht unbedingt eine zum Zeitpunkt bestehende rheumatische Aktivität an, d.h. ein erneuter Streptokokkeninfekt führt nicht als *conditio sine qua non* zu einem neuen

rheumatischen Schub (TARAN und Mitarbeiter, LONGCOPE).

Akute Streptokokkeninfektionen, ein akuter Rheumatismus, gehen in den meisten Fällen mit ASR-Erhöhung einher; durch Penicillingaben kann diese aber unterdrückt werden (NEUHAUS, GALTS).

Bei chronischen Infektionen, beim chronischen und subakuten Rheumatismus, nach überstandenen Streptokokkeninfektionen, lässt uns die ASR im Stich (NEUHAUS, ALEXANDER, GALTS, SCHMIDT). Wir können z.B. nicht diagnostizieren, ob ein erworbener Herzfehler durch eine überstandene Streptokokkeninfektion hervorgerufen wurde.

B. CrP

Von größerer Bedeutung bei einem rheumatischen Prozeß ist nach Mc. CARTY das Vorhandensein des C-reaktiven Proteins (CrP) im Blut, ein Stoff, der erstmalig im Jahre 1947 aus einer pathologisch-serösen Flüssigkeit gewonnen wurde. Nach Mc. CARTY ist dies ein β -Globulin, das an ein Lipid gebunden sein soll. BURTIN, der es bei Kindern mit akutem rheumatischem Fieber nachwies, ordnet das CrP in die β_1 -Fraktion ein, während HARTMANN es in die Fraktion zwischen β + γ legt.

Beim Gesunden kommt das Protein nicht vor, es besitzt antigene Eigenschaften und kann somit durch ein spezifisches Antiserum, das von Kaninchen nach Sensibilisierung durch wiederholte Injektionen von gereinigtem CrP gewonnen wird, nachgewiesen werden. Mit dem quantitativen Nachweis (ZACH) des CrP's im Serum ist aber nur der Hinweis auf akut entzündliche oder nekrotisierende Prozesse im Organismus gegeben. Es wird keine Aussage darüber gemacht, welcher Art sie gerade ist. So ist der Nachweis von Crp noch lange kein Beweis dafür, daß ein akuter Rheumatismus die Ursache ist. Zumal

WAGNER und JANSSON das CrP bei akuter Meningitis und Poliomyelitis, KROOP und SCHACHMAN, KOZONIS, BOLTAX und FISCHEL das CrP beim Myokardinfarkt stark erhöht fanden. ELSTER und Mitarbeiter beobachteten weiter eine CrP-Erhöhung bei Patienten mit muskulären Herzinsuffizienzen nur dann, wenn gleichzeitig Fieber und pulmonale Erscheinungen vorlagen.

"Bei sicherem klinischen Ausschluß anderweitiger akuter Ursachen ist das CrP beim Rheumatismus, entsprechend der Aktivität der im Gewebe ablaufenden Prozesse, als unspezifisches Aktivitätsdiagnosticum brauchbar" (NEUHAUS). "Unter Cortison-Therapie verschwindet das CrP auch beim akuten Rheumatismus" (SCHMIDT).

Akute Streptokokkeninfektionen und akute rheumatische Erkrankungen kann man serologisch aufdecken, indem man ASR und CrP bestimmt. Chronisch verlaufende Streptokokkenenerkrankungen, eine subklinisch rheumatische Aktivität oder eine überstandene Streptokokkeninfektion werden durch keine Methode erfaßt.

II. Theoretische Grundlagen einer neuen Methode zum Nachweis einer akuten oder überstandenen Streptokokkeninfektion.

Im Rahmen einer internen Schutzimpfung, die an Gesunden und solchen Patienten durchgeführt wurde, die unter rezidivierender Streptokokkenpharyngitis litten, kamen POTTER, STOLLERMAN und SIEGEL zu einem beachtenswerten Nebenfund. Patienten, die einmal eine Streptokokkeninfektion durchgemacht hatten, deren Antikörpergehalt fast oder ganz abgesunken war, antworteten nach einer einmaligen, geringen Dosis N, bezogen auf M-Protein, die je nach Verträglichkeit in einer bzw. auf 3 Injektionen verteilt gegeben wurde, innerhalb von 1 bzw. 3 Wochen mit einem Antikörperanstieg, der gleich oder gar höher war als der, welcher der natürlichen Infektion

gefolgt war. Daß dieser Anstieg ein einmaliger Effekt war, zeigte sich darin, daß ein erneuter N-Stoß nicht mehr mit Antikörpererhöhung beantwortet wurde.

Diese spontane Antikörpererhöhung nach einer einmaligen Gesamtdosis N, jeweils bezogen auf M-Protein, könnte klinische Bedeutung finden. Sie setzt dort an, wo besonders die ASR versagt. Durch Verwendung dieser Methode könnte man differentialdiagnostisch feststellen, ob z.B. ein erworbener Herzfehler auf der Basis einer Streptokokkeninfektion beruht.

Dies ist auch der Leitgedanke für die später folgenden Betrachtungen.

Zum besseren Verständnis der folgenden Schritte muß noch etwas über die Antigene kurz gesagt werden. Die Hauptantigene der Streptokokken-Gruppe A sind:

1. Das typenspezifische M-Protein und
2. das gruppenspezifische Polysaccharid C
(Mc.CARTY, SCHMIDT),

bestehend aus Rhamnose und Glucosamin als N-Acetylderivate. Da diese beiden Komponenten, Eiweiß und Kohlehydrate, die Hauptbestandteile von Streptokokkenzellwänden sind, ist es möglich, schon allein durch deren Injektion, kontrollierbare Mengen von Antigenen zuzuführen und Reaktionen auf diese im Organismus konstant bleibende Menge Antigen zu notieren. Auf der anderen Seite kann auch durch kleinste Dosen von Zellwänden, die nun in steigenden Mengen gegeben werden, ein Organismus aktiv immunisiert werden.

Im folgenden wird dieser Gedanke in die Tat umgesetzt. Es wird ein Impfstoff aus Zellwänden hergestellt und dieser später am Kaninchen ausprobiert.

Bei der Herstellung des Impfstoffes wurden die Regeln der Autoren STOLLERMAN und Mitarbeiter zugrunde gelegt. Aus technischen Gründen waren zahlreiche Modifikationen erforderlich.

III. Herstellung des Impfstoffes

A. Originalmethode nach STOLLERMAN, SIEGEL und JOHNSON.

Anleitung nach BARKULIS und JONES, BARKULIS und Mitarbeiter.

Die Keime, die für den entsprechenden Impfstoff verwendet werden sollten, ließen die Autoren entweder in Todd-Hewitt-Bouillon (Difco) oder in einem autoclavierten Aufguß aus Hirn und Herz (Difco) wachsen, modifiziert jeweils durch phosphatgepufferte Glukose, um annähernd 1,5 % Zucker zu erhalten. Diese phosphatgepufferte Glukose setzte sich zusammen aus

1. 18 g Glukose
 3 g NaCl
 1,5 g Na_2HPO_4 (pH = 7,2 - 7,5)

oder

2. 1 % Glukose
 0,3 % NaHCO_3
 0,05% NaH_2PO_4 . H_2O
 0,22% Na_2HPO_4 . $7\text{H}_2\text{O}$

Die Wahl dieser oder jener Zusammensetzung beeinflusste nicht das Ergebnis!

Die genannten Autoren stellten sich 12- bis 16-Stunden-Kulturen her, zentrifugierten mit 4000 min^{-1} und wuschen die Keime 3x in destilliertem Wasser. Jede Zellanhäufung schwemmten sie in 10 ml destilliertem Wasser auf. 5 ml Portionen dieser Zellaufschwemmung vermischten sie mit einer gleichen Menge Ballotoni Nr. 12 Glasperlen (5 mg) in 20 ml Gläsern und verschlossen diese

mit Gummistöpseln. Das Gemisch bearbeiteten sie dann mit einem Mickle-Disintegrator, unter folgenden Bedingungen:

Zeit: 20 min
Amplitude: 1,5 cm
Frequenz: 60 Hz

Das reichte aus, um die Zellen aufzubrechen, ohne aber die Zellwände zu zerstören. Jede einzelne Portion wurde entweder unter einem Elektronenmikroskop oder unter einem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Glaskugeln wurden durch Filtration mit einem groben Filter entfernt. Anschließend wurden die Zellwände 30 Minuten bei 4 °C mit 16 000 G zentrifugiert, weiter in höchstens 100 Vol 0,2 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) wieder aufgeschwemmt, danach 30 Sekunden lang mit einem Waring-Blender gemischt und erneut 30 Minuten lang mit 16 000 G zentrifugiert. Auf diese Art und Weise wurde 5 x mit Phosphatpuffer und ein 6. x mit destilliertem Wasser gewaschen. Die so gereinigten Zellwände wurden nun wieder in 100 ml pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung, die 0,9 % Benzylalkohol enthielt, suspendiert, 15 Minuten lang unter einem Druck von 1,5 atü autoklaviert und sofort in einem Trockeneis-Alkoholbad eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

Bevor der so gewonnene Impfstoff den Patienten injiziert wurde, bestimmten die Autoren den N-Gehalt nach der Mikro-Kjeldahl-Methode: 1 ml von 5 ml Portionen sollte 3 bis 4,5 mg Zellwandtrockengewicht und 218 bis 272 µg N enthalten. Wenn auch diese Forderung erfüllt war, wurden aus dem Zellwandextrakt Lösungen hergestellt, die den zur Impfung erforderlichen N-Gehalt aufwiesen. Diese wurden kurz vor Einimpfung auf Sterilität geprüft.

Die für die Impfstoffherstellung verwendete Kultur vom Typ 12 der Gruppe A zeichnete sich durch eine beson-

dere Toxizität aus. Diese Kultur S F 42 war ursprünglich 1934 durch GRIFFITH von einem Scharlachkranken durch Abstrich gewonnen worden und wurde den Autoren 1956 von Dr. REBECCA LANCEFIELD in Form einer lyophilisierten Kultur übergeben. Am Anfang enthielt diese Kultur noch die für Gruppe A typischen Polysaccharide. Nach einigen Mäusepassagen mutierte diese Kultur zu einer Variante, die das Polysaccharid V = Variant (MC CARTY, LANCEFIELD) enthielt. Diese Mutante zeichnete sich durch einen besonders hohen Prozentsatz an 12-M Protein aus. Die toxische Wirkung wurde auf das Fehlen der Polysaccharide der Gruppe A zurückgeführt.

8. Eigene Methode.

Ausgangspunkt für die Versuche waren Streptokokken vom Typ 19 der Gruppe A. Die Kultur wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Seelemann aus Kiel zur Verfügung gestellt. Da in der Klinik, in der die Versuche, über die hier berichtet wird, durchgeführt wurden, besonders gute Erfahrungen mit der Todd-Hewitt-Brühe gemacht worden waren (Habilitationssarbeit M. ALEXANDER), wurde sie auch diesmal für die Gewinnung der Keimkonzentrate angewendet.

Modifizierte TODD-HEWITT-Bouillon

Auf 1000 ml Wasser wurden folgende Stoffe gegeben:

- 10 g Maggi oder Liebig-Extrakt (bei Liebig's Fleischextrakt zusätzlich 2 g NaCl)
- 10 g Pepton
- 2 g NaHCO_3
- 1 g Na_2HPO_4
- 2 g Trypsin
- 1 g Glukose

Das Gemisch wurde eine Stunde gekocht, auf einen pH-Wert von 7,5 bis 7,7 eingestellt und filtriert.

16-Stunden-Kulturen wurden gewonnen, mit $4\,000\text{ min}^{-1}$ zentrifugiert und laut Vorschrift 3 x in destilliertem Wasser gewaschen. Jedes Zellkonzentrat wurde in 10 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt.

Soweit wurde vorschriftsmäßig vorgegangen.

Die nun folgende Zelleröffnung bereitete unvorhergesehene Schwierigkeiten, da der für das Verfahren bewährte Mickle-Disintegrator in Berlin nicht zu beschaffen war.

Wirkungsweise und Probleme beim Mickle-Disintegrator

Früher wurden bei ähnlichen Verfahren Keime und Gewebe im Mörser von Hand zermahlen. Diese Methode war aber aus folgenden Gründen nicht ideal:

1. dauerte der Vorgang zu lange,
2. entstanden große Materialverluste, und
3. mußte das Material hinterher immer sterilisiert werden.

MICKLE schlägt daher vor, bewegliche Röhren, in welche die Gefäße mit dem zu behandelnden Inhalt gebracht werden, zu benutzen. Diese werden nun magnetisch über Spulen bewegt. Aus Gründen der Stabilität werden jeweils zwei Röhren symmetrisch gleich einer Stimmgabel angeordnet, so daß gleichzeitig zwei Gemische bearbeitet werden können. Es hat sich gezeigt, daß es günstig ist, die Gefäße horizontal anzubringen, d.h. ihre Achsen müssen in der gleichen Ebene sein wie die der Röhren, in der die Vibration stattfindet. Würden die Achsen senkrecht dazu stehen, würden Wirbelströme, die die in den Gläsern befindliche Flüssigkeit an die Wand drücken, entstehen. Ein Aufbrechen der Zellen würde verhindert werden.

Werden die Gefäße senkrecht angebracht, so muß ihre Wand durch vorspringende Beläge ausgekleidet sein, die die Wirbelströme zerhacken.

Die Eröffnung erfolgt, wenn die Röhren ihre Richtung ändern, so daß sich Impulse auf die Flüssigkeit auswirken. Diese werden durch das unterschiedliche spezifische Gewicht von Flüssigkeit und Teilchen verstärkt. Der Erfolg steigt mit der Schwingweite der Röhren. Je größer diese ist, um so kürzer ist die Zeit, in der man das gleiche Ergebnis erzielt. Eine Grenze wird durch das Material der Röhren selbst gesetzt, da dieses bei zu schnellem Arbeiten zu Bruch gehen kann. Beste Werte werden erzielt, wenn die magnetisch polarisierten Röhren mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Schwingweite von 12,7 mm bis 19,5 mm sich bewegen. Das Material ist vergüteter Edelstahl. Die Maße sind:

Länge = 228,6 mm bei einer Querschnittsfläche von 31,75 X 4,76 mm.

Die Röhren müssen mit größter Vorsicht eingesetzt werden, damit sie während des Arbeitsvorganges nicht zerbrechen. Es ist wichtig, die beiden Röhrenenden mit dem gleichen Material, aus dem die Röhren selbst bestehen, zu verstärken.

Das Gerät in seiner jetzigen Form besteht aus einem Gußeisengerüst, das die beiden beweglichen Röhren hält. An ihren Enden sind Leichtmetallbehälter fest montiert, in die Pyrex-Glasbehälter eingelassen sind. Jede Röhre geht durch eine Gleichstromspule, die in entgegengesetzter Richtung gewickelt ist. Die Röhren selbst sind so polarisiert, daß sie an dem einen Ende einen permanenten Nordpol, an dem anderen einen entsprechenden Südpol haben. An einer angegebenen Stelle ist noch ein Wechselstrommagnet mit einem Hufeisenkern angebracht. Daraus ergibt sich, daß in der ersten Hälfte einer Arbeitsphase

wenn die Röhren wie der Kern des Wechselstrommagneten gepolt sind, diese von ihm abgestoßen werden, sie aber selbst sich aufeinander zubewegen; in der zweiten Hälfte, wenn der Magnetkern umgepolt ist, werden die Röhren von diesem angezogen, sie bewegen sich also voneinander fort.

Die Schwingzeit kann durch einen Rheostaten kontrolliert werden, der die polarisierten Spulen variiert.

Die Gesamtapparatur ist auf eine Guß-Aluminium-Grundplatte montiert und von einem Duralumin-Gehäuse umschlossen. Die Behälter können auch so konstruiert sein, daß zusätzlich Kontrollfenster eingelassen sind. Die Verwendung derartiger Behälter ist jedoch bei infektiösem Material nicht ratsam, da es verspritzt, wenn ein Glas zerbricht.

Ein Gerät, mit dem die gleichen Effekte erreichbar sind wie mit dem beschriebenen Mickle-Disintegrator ist der Zellhomogenisator der Firma Braun.

Zellhomogenisator der Firma Braun.

Dieser Homogenisator arbeitet nach dem Rotationsprinzip und ist besonders zur Gewinnung zellfreier Extrakte geeignet. Die Suspension des zu bearbeitenden Gutes wird in einer 75 ml Duranglasflasche zusammen mit kleinen Glasperlen geschüttelt. Diese Flasche, deren Schliffstopfen besonders gesichert wird, ist mit Gummipolstern in einem Stahlrohr gelagert, dessen Achse mit 2000 min^{-1} bzw. 4000 min^{-1} eine kreisförmige Bewegung beschreibt. Das Rohr selbst läuft in reichlich dimensionierten Wälzlagern und wird durch Federzüge an der Rotation gehindert. Ein sehrstarkwandiges Stahlrohr, in dessen Innerem das exzentrisch gelagerte Stahlrohr mit der Aufnahme für die Duranglasflasche angeordnet ist, dient als Schutz. Die gesamte Anordnung ist in Schwingmetall gelagert und sorgfältig ausgewuchtet.

Zur Kühlung des Homogenisators bzw. der die Suspension und die Glasperlen enthaltenden Flasche wird flüssiges CO_2 verwendet, das einer Steigrohrflasche entnommen und über eine flexible Kapillarleitung dem Inneren des Stahlrohres zugeführt wird.

Bei Vorkühlung und entsprechender Regulierung des Kühlstromes kann man auch bei längerem Laufen die Temperatur des Schüttelgutes unterhalb 5°C halten.

Der Antrieb erfolgt durch einen polumschaltbaren Drehstrommotor; die Wahl der Frequenzen 2000 min^{-1} und 4000 min^{-1} ist durch einfache Schalterbetätigung möglich.

Für enzymatische Arbeiten mit Hefen genügen Laufzeiten von 30 bis 60 Sekunden für eine Zerstörung von 80 bis 99 % der suspendierten Zellen.

70 bis 99 % verschiedenartiger Bakterien werden in 1 bis 2 Minuten zerschlagen.

Daten des Antriebsmotors:

Frequenz: $f_1 = 2000\text{ min}^{-1}$; $f_2 = 4000\text{ min}^{-1}$

Antrieb: 0,4 kW; 380 V Drehstrom, polumschaltbar; 50 Hz

Mit diesem Gerät wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. 10 ml Kokkenaufschwemmung + 1ml Glasperlen $0,1\text{ mm}^\phi$:
Nach einer Minute Laufzeit war die Pseudoagglutination aufgehoben.
2. 10 ml Kokkenaufschwemmung + 3 ml Glasperlen $0,1\text{ mm}^\phi$:
Nach 1 Minute Laufzeit ($f = 2000\text{ min}^{-1}$) sind $1/4$ der Kokken aufgebrochen.
3. 10 ml Kokkenaufschwemmung + 3 ml Glasperlen $0,1\text{ mm}^\phi$:
Nach 1 Minute Laufzeit ($f = 4000\text{ min}^{-1}$) sind $1/2$ der Kokken aufgebrochen.

4. 20 ml Kokkenaufschwemmung + 10 ml Glasperlen 0,17 bis 0,18 mm ϕ :
Nach jeweils 1 Minute Laufzeit Wechsel von f_1 auf f_2 sind nur ca. 5 % der Kokken aufgebrochen.
5. 20 ml Kokkenaufschwemmung + 10 ml Glasperlen 0,45 bis 0,50 mm ϕ :
Nach jeweils 1 Minute Laufzeit Wechsel von f_1 auf f_2 ; nur ca 5 % der Kokken werden aufgebrochen.
6. 40 ml Kokkenaufschwemmung + 20 ml Glasperlen 0,1 mm ϕ :
Nach 4 Minuten, 40 Sekunden Laufzeit, davon je 1 Minute, 10 Sekunden mit 20 sec f_1 + 40 sec f_2 + 10 sec f_1 , gelang 90 bis 95 % Zelleröffnung.
Dies war deutlich unter dem Phasenkontrastmikroskop zu erkennen.

Da an 40 ml-Portionen gute Erfahrungen gesammelt worden waren und die Gefäße auch nur für diese Mengen vorgesehen sind, wurde der Impfstoff in 40 ml-Portionen hergestellt.

Wie angegeben wurden 16-Stunden lang bebrütete Kulturen gewonnen und nach dem oben beschriebenen Verfahren eröffnet. Vor der Weiterverarbeitung wurde jeweils noch ein zweiter Kontrollversuch durchgeführt, um auszuschließen, daß doch noch zahlreiche Keime nicht eröffnet sind, die Wachstumsprobe.

Die Wachstumsprobe

Blutplatten und Bouillonröhrchen wurden beimpft und bei 4 °C inkubiert. Es traten keine Koloniebildungen mehr ein. Eine Inkubation bei 21 °C ergab minimales Wachstum.

Die Zellwände wurden in einer Sprincozentrifuge mit 13000 min⁻¹ 30 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert und in 0,2 M-Phosphatpuffer (pH = 7,4) aufgeschwemmt. Da kein Waring Blendor zur Verfügung stand, wurde ein Ultra-Turrax herangezogen, um die Zellwände von der Gefäßwand loszulösen. Anschließend wurde wieder mit 13000 min⁻¹ zentrifugiert, nochmals Phosphatpuffer aufgeschwemmt und weiter nach Vorschrift vorgegangen. Da kein Phosphatpuffer mehr zur

Verfügung stand, wurde für die letzten Arbeitsgänge physiologische Kochsalzlösung gewählt. Zum Schluß wurden die Zellwände in destilliertem Wasser aufgeschwemmt.

Der Zellwandstickstoff wurde nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Die Werte aus zwei verschiedenen Impfstoffansätzen waren:

1. 1 ml enthielt $56 \mu\text{g N}$
2. 1 ml enthielt $49 \mu\text{g N}$

Danach entsprach die Ausbeute $1/5$ des N-Gehaltes, den STOLLERMAN und Mitarbeiter erreichten.

Die Ursache lag in der Arbeitsmethode. Bei der Eröffnung der Zellen muß ein großer Prozentsatz des Zellmaterials zwischen den abgesetzten Glaskugeln liegengeblieben sein. Da aber nach N-Gehalt geimpft wurde, war der Unterschied belanglos.

Entsprechend der durchzuführenden Impfung wurde der Impfstoff in Ampullen eingeschmolzen.

Zur Ausschaltung heterogener, pyrogener Stoffe war es erforderlich, streng steril zu arbeiten. Zur Beseitigung dieser Stoffe von den Glasperlen, Trichtern und Stopfflaschen war es wichtig, sie vor dem Sterilisieren mit Chromschwefelsäure zu behandeln.

Verfahren zum Pyrogenfreimachen von Glaswaren

1. Ca. 18 Stunden lang wirkte Chromschwefelsäure auf die Glaswaren ein, danach wurde
2. mit Aqua dest. gewaschen, anschließend wurde
3. mindestens 12 Stunden bei 70°C getrocknet und schließlich
4. bei 120°C 15 Minuten lang autoclaviert.

Zu 1. und 2.:

Die Glasperlen wurden nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure über einen G_2 -Filter abgossen; damit wurden

90 bis 95 % der Chromschwefelsäure entfernt, Um Aquadest. zu sparen, wurde 20 bis 30 mal mit Aqua fontana gespült. Wichtig waren gutes Schütteln und sich absetzen lassen. Solange die Flüssigkeit grünlich blieb, war noch Chromschwefelsäure in der Flüssigkeit. Zum Schluß wurde mit Aqua dest. klar-gespült.

V. Durchführung der Impfungen

A. Nach der Literatur

1. Hautteste und Reaktionen nach kleinsten intrakutanen und größeren subkutanen Stickstoffgaben.

STOLLERMAN und Mitarbeiter prüften die Hautverträglichkeit des Impfstoffes, indem sie Dosen von 0,05 μ g N in-trakutan einimpften. Sie untersuchten:

1. 18 gesunde Erwachsene:

7 von ihnen entwickelten innerhalb von 30 Stunden lokale Rötung und Infiltration bis zu einer Größe von 1 bis 3,5 cm.

2. 30 Kinder:

6 antworteten innerhalb von 30 Stunden mit Rötung und Infiltration an der Injektionsstelle.

Aus der Gruppe Erwachsener wählten sie drei Patienten aus, deren Hauttest negativ ausgefallen war und gaben ihnen höhere Stickstoffdosen, diesmal aber subkutan.

Person 1 erhielt 2,5 μ g N: Die Injektionsstelle blieb reaktionslos

Person 2 erhielt 25 μ g N: Die Injektionsstelle zeigte Rötung und Schwellung, zusätzlich traten Übelkeit und Fieber auf.

Person 3 erhielt 50 μ g N: Es traten lokale Rötung und Schwellung auf, weiter Schmerzen, lokale Lymphadenitis, Fieber und Übelkeit.

Die Autoren folgerten daraus, daß größere N-Dosen auf mehrere, kleinere Injektionen verteilt werden müssen. Besonders war dies für Kinder wichtig. Diese entwickelten bei einer subkutanen Einzeldosis von 15 bis 30 μ g ausgedehnte Infiltrate, die noch nach einer Woche palpabel waren. Diese Knötchen waren selten größer als 1 cm und mußten nicht behandelt werden. Fieber und Übelkeit fehlten in den meisten Fällen.

2. Vollständig durchgeführte Immunisierung.

Geimpft wurden Patienten, die nach den Aufzeichnungen des "Children's Memorial Hospital" seit 1956 an rezidivierender Streptokokkenpharyngitis litten. Es wurde zunächst so verfahren, daß allen Patienten als Probe eine Dosis von 0,05 μ g N intrakutan gegeben wurde.

Entsprechend der Reaktion nach 30 Stunden wurde die Behandlung wie folgt fortgesetzt:

1. Patienten mit Rötung oder Infiltration von mehr als 1 cm Durchmesser wurden nicht geimpft.
2. Patienten mit Rötung oder Infiltration von 1 cm Durchmesser oder weniger erhielten die Hautdosis 10 mal subkutan.
3. Patienten, die keine Rötung oder Infiltration aufwiesen, erhielten die Testdosis 50 mal subkutan.

Die Personen der Gruppen 1. und 2. bekamen anschließend wöchentlich eine Injektion, die die 2- bis 5-fache Menge N der jeweils vorangegangenen Dosis enthielt. Da die Verträglichkeit von N bei den einzelnen Patienten verschieden war, schwankten auch die Gesamtdosen zwischen 7 und 56 μ g N.

3. Methoden zum Nachweis von Antikörpern im Blut.

Blutuntersuchungen auf Antikörper vor und nach erfolgter Impfung wurden durchgeführt und gaben Auskunft über den Erfolg der Impfung. Um eine frische Streptokokkeninfektion auszuschließen, wurden außerdem Halsabstriche wöchentlich

untersucht. Auf diese Weise konnte zwischen folgenden Patienten unterschieden werden.

1. Erwachsene, die Dosen von 2,5 μ g N, 25 μ gN oder 50 μ g N subkutan bekommen hatten und bei denen keine Streptokokkeninfektion nachzuweisen war.
2. Kinder, die einmal eine Typ 12 - Streptokokkeninfektion durchgemacht hatten, deren Antikörpergehalt aber wieder ganz oder fast ganz abgesunken war.
3. Erwachsene, die nach einer Streptokokkeninfektion kaum oder nicht nachweisbare Antikörper gebildet hatten.
4. Patienten, bei denen nie sicher eine Streptokokkeninfektion nachgewiesen wurde.

Der Antikörpergehalt wurde nach dem "Bactericidal-Test" und nach dem "Long-chain-Test" bestimmt.

Bactericidal-Test.

(modifiziert nach LANCEFIELD; Anleitung: STOLLERMAN)

Bei diesem Test wird das Wachstum virulenter Streptokokken im Menschenblut, das typenspezifische Antikörper enthält mit dem Wachstum in einem Blut, das keine Antikörper enthält verglichen.

Sterile Objektträger werden mit 0,1 ml Kulturaufschwemmung beimpft, um auszuzählen, wieviel Keime in das Teströhrchen gegeben wurden. Nach einer 3 Stunden langen Bebrütung des Serums im Rotierapparat erfolgt eine neuerliche Auszählung. Zur Kontrolle wird jedem Ansatz ein positives und ein negatives Vergleichsserum, das vom Kaninchen gewonnen wurde, hinzugefügt.

Die Wachstumshemmung WH ist definiert als der Quotient aus der Zahl der vor der Bebrütung inokulierten Keime I und der Zahl der nach der Bebrütung im Serum vorhandenen Keime S.

$$WH = \frac{I}{S}$$

Die Wachstumshemmung WH_T in einem Testserum S_T , das typenspezifische Antikörper enthält, bezogen auf die Wachstumshemmung WH_N in einem Normalserum S_N ergibt den "Bactericidal-Index" BI.

$$BI = \frac{WH_T}{WH_N} = \frac{I_T/S_T}{I_N/S_N}$$

Bei diesem Test ist es wichtig, daß Streptokokken verwendet werden, die sich lebhaft im Normalblut vermehren und innerhalb von 3 Stunden auf das 64-fache anwachsen. Stämme dagegen, die arm an M-Protein und somit kaum virulent sind, werden teilweise phagocytiert. Die Phagocytose wird durch vorhandene Antikörper kaum beeinflußt. Stämme, bei denen die Wachstumshemmung im Normalserum $WH_N = I_N/S_N = 1/32$ ist, sind demnach für den Ansatz ungeeignet. Dagegen sind solche Stämme, die den geringen Wert $WH_N = 1/64$ erreichen, geeignet.

Die Aussage des BI-Wertes kann wie folgt formuliert werden:

BI = 1: Wachstum im Testblut gleich Wachstum im Normalblut.

BI = 100: Wachstum im Testblut ist 100 mal kleiner als im Normalblut.

Nach der Erfahrung kann die Wachstumshemmung an Hand der gefundenen BI-Werte wie folgt beurteilt werden:

BI-Wert	Urteil
bis 50	negativ
50 bis 200	positiv
200 bis 500	stark positiv
über 500	sehr stark positiv

"Long-chain-Test"

(Lang-Ketten-Test, EKSTEDT, STOLLERMAN)

Streptokokkenstämme der Gruppe A wachsen in langen Ketten, wenn sie in ein Medium hineingebracht werden, das homologes Antiserum enthält. Werden dem Medium heterologe Anti-

seren zugegeben, so mißlingt der Versuch, die Ketten bleiben kurz. Die Reaktion bleibt auch dann negativ, wenn die Konzentration des Antiserums unter 0,25% liegt. Positive Ergebnisse treten bei Ansätzen auf, die mindestens 20% Serum enthalten (STOLLERMAN u. SIEGEL).

Die Reaktion selbst ist unabhängig von jeglichem Komplement und von hitzelabilen Plasmafaktoren, wie für den "Bactericidal-Test" noch ausgeführt werden wird. Jedoch die Zugabe von Trypsin, das das M-Protein aus den Kokken herauslöst, stört den Effekt. Davon abgesehen hängt die Kettenbildung lediglich vom konstanten Vorkommen der Antikörper ab.

Für eine erfolgreiche Durchführung des Tests sind folgende Gesichtspunkte zu beachten:

1. Die Streptokokken müssen einen hohen M-Protein-gehalt aufweisen.
2. Der Eiweißgehalt des Nährbodens ist von Bedeutung. Gute Bedingungen sind gegeben, wenn zur Beimpfung Todd-Hewitt-Brühe mit einem pH-Wert von 7,5 bis 8,0 verwendet wird.
3. Die Human-Seren müssen frei von Konservierungsmitteln sein, da sich sonst keine Ketten bilden. Am besten ist es, wenn das Blut bei 4 °C steril aufbewahrt wird.

Die Durchführung des Long-chain-Testes.

Zu 3 ml Todd-Hewitt-Brühe in einem Teströhrchen von 9 mm Breite und 100 mm Länge werden 0,05 ml Antiserum und 0,1 ml einer 10^{-2} -Lösung Streptokokkenkultur, die zuvor während ca. 12 Stunden in Todd-Hewitt-Brühe gewachsen war, gegeben. Zur Kontrolle wird ein gleiches Röhrchen mit Normalserum angerichtet. Die Gläser werden dann mit sterilen Gummistöpseln verschlossen und 4 Stunden lang bei 37 °C 8 x pro Minute über Kopf gekippt.

Danach werden bei beiden Lösungen die Kokken von jeweils 50 Ketten im hängenden Tropfen ausgezählt.

STOLLERMAN und Mitarbeiter kamen auf diese Weise zu folgendem Ergebnis:

1. Serum, das Antikörper enthält, bildet Ketten von 50 bis 100 Kokken
2. Serum, das keine Antikörper enthält, bildet Ketten von nur 4 bis 12 Kokken.

Bei der Anwendung dieser Methode für die Bestimmung der Antikörper im Serum der oben genannten Versuchspersonen, stießen Stollerman und Mitarbeiter auf Schwierigkeiten. Diese betrafen die Frage nach der Zahl der Streptokokken, die für jeden Versuchsansatz erforderlich sind.

Um im Bactericidal-Test einen niedrigen Antikörpertiter bestimmen zu können, genügen 10 bis 150 Kokken in 0,1 ml Aufschwemmung. Eine größere Menge verschleiert das Bild, da sich die Erreger trotz des Antikörpergehaltes im Testserum vermehren. Dagegen ist diese Keimzahl für den Long-chain-Test völlig unzureichend. Für diesen Test ist es notwendig, daß mindestens 10 000 Steptokokken je 0,1 ml Aufschwemmung vorhanden sind, damit eine Kettenbildung erkannt werden kann. Anderenfalls führt der Versuch zu keinem Ergebnis.

Trotz eines vorhandenen Antikörpergehaltes kann im Bactericidal-Test ein negatives Ergebnis anfallen, wenn einige unspezifische Plasmafaktoren im Testblut fehlen. Dies zeigten STOLLERMAN und EKSTEDT. Bei 25 Personen bestimmten sie zunächst den M-Antikörpergehalt im Blut durch den Long-chain-Test. Obgleich alle Proben einen hohen Wert aufwiesen, mißlang in 2 Fällen der Versuch, dies auch durch den Bactericidal-Test nachzuweisen. Daraus schlossen STOLLERMAN und Mitarbeiter, daß unter in vitro-Bedingungen neben dem M-Protein noch Plasmafaktoren im Bactericidal-Test eine Rolle spielen.

Wenn diese fehlen, sind die Leukozyten nicht mehr der Phagocytose fähig. Die Plasmafaktoren, deren Vorhandensein rein hypothetisch ist, könnten auch das im Bactericidal-Test unterschiedliche Verhalten von Testseren verschiedener Laboratoriumstiere mit gleichem Antikörpergehalt erklären. Da das Vorhandensein von Plasmafaktoren nur vom Menschen- und Affenblut bekannt ist, können positive Ergebnisse allenfalls in derartigen Seren erwartet werden. Dabei soll die Körpertemperatur nicht überschritten werden, da die Plasmafaktoren, auch als PPF = Phagocytosis provoking factors bezeichnet, hitzeempfindlich sind.

Neben den Plasmafaktoren spielen im Bactericidal Test nicht nur die Zahl der Keime, die in 0,1 ml Aufschwemmung enthalten sind, sondern auch die Formvariation des Erregers eine Rolle. Werden im Bactericidal Test kapselhaltige Streptokokken verwendet, dann tritt unabhängig von der Titerhöhe maximale Phagocytose ein, sofern Antikörper vorhanden sind. Wird jedoch gegen entkapselte Streptokokken getestet, dann werden die Keime entsprechend dem Antikörpergehalt im Testserum entfernt.

STOLLERMAN und Mitarbeiter schlossen daraus, daß im Bactericidal-Test zwei Voraussetzungen erfüllt sein müssen:

1. Das Vorhandensein von Antikörpern.
2. Das Vorhandensein von PPF.

Der Bedarf an PPF ist sehr unterschiedlich. Werden im Test kapselhaltige Streptokokken verwendet, dann sind nur Spuren von Plasmafaktoren notwendig. Wird dabei ein sehr geringer Grenzwert überschritten, erfolgt unabhängig von der Höhe des Antikörpertiters maximale Phagocytose.

Anders verhält es sich, wenn zur Antikörperbestimmung im Bactericidal-Test entkapselte Streptokokken verwendet

werden. Damit überhaupt der Beginn einer Phagocytose erkannt werden kann, muß der Gehalt an PPF hoch sein. Die weitere Zugabe von Plasmafaktoren allein kann die Phagocytose nicht steigern. Entscheidend ist der Antikörpertiter im Testserum.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß im Bactericidal-Test nur dann Antikörperwerte festgestellt werden können, wenn gegen entkapselte Streptokokken getestet wird und das Testserum PPF enthält.

Mit Hilfe des "Long-chain-" und des "Bactericidal-Testes" wurde das Blut von Patienten, die entsprechend ihrer Gruppe verschiedene Mengen N erhalten hatten, vor und nach der Impfung auf Antikörper untersucht!

4. Ergebnisse

Gruppe 1: Sie bestand aus drei Personen, die im Hauttest nicht reagiert hatten und danach höhere Dosen N subkutan erhielten.

- a) 2,5 µg N: Dieser Patient wies bereits vor Impfung einen hohen Antikörpertiter auf, nach der N-Injektion änderte dieser sich nicht.
- b) 25 µg N: Vor und nach erfolgter Impfung traten keine Antikörper auf.
- c) 50 µg N: Bereits vor Injektion waren Antikörper von geringer Titerhöhe nachweisbar. Eine Woche nach erfolgter Impfung mit M-Protein vom Typ 12 fiel ein Titeranstieg auf. Es erhob sich die Frage, ob dieser spontane Titeranstieg nach einer einmaligen Dosis N eine Individualreaktion oder eine Gesetzmäßigkeit sei.

Gruppe 2: Sie bestand aus zehn Kindern, die eine Streptokokkeninfektion vom Typ 12 hämolysierender

Streptokokken der Gruppe A durchgemacht hatten, und bei denen kurz nach der Erkrankung ein Antikörpertiter nachgewiesen worden war, der dann innerhalb von zwei Jahren auf eine nicht mehr nachweisbare Höhe abgefallen war.

Da die Kinder im Hauttest besonders heftig auf N-Gaben reagiert hatten, wurde die entscheidende N-Dosis auf 3 bis 4 Injektionen mit wöchentlichen Abständen verteilt. Auffallend war die Gesamtdosis N. Sie schwankte bei den Kindern zwischen 4 und 44 μ g N, während bei den Erwachsenen eine Dosis zwischen 25 und 50 μ g N erforderlich war, um eine Antikörpererhöhung zu erreichen.

Alle Kinder wiesen - durch die N-Verteilung zeitl. auseinandergezogen - nach drei Wochen einen deutlichen Titeranstieg auf. Er war spezifisch gegen Streptokokken vom Typ 12 gerichtet und gleich oder gar höher als der Titer, der nach der überstandenen Infektionskrankheit bestimmt worden war.

Gruppe 3: In dieser Gruppe waren Patienten, die zwar schon eine Streptokokkeninfektion durchgemacht hatten, bei denen aber keine oder nur wenige Antikörper nachgewiesen worden waren.

Sechs der Patienten waren an einer Infektion vom Typ 12 und vier an einer vom Typ 5 erkrankt gewesen.

Bei den zuerst genannten sechs Personen traten bereits nach einer Injektion innerhalb von drei Wochen Antikörper auf. In einem Falle wurde ein sehr hoher Titer festgestellt; eine weitere Person zeigte mäßigen Titeranstieg. Alle anderen bildeten mindestens Spuren von Antikörpern.

Deutlich fiel auf, daß diejenigen, die eine Infektion vom Typ 5 durchgemacht hatten, auf eine Injektion N vom Typ 12 nicht reagierten

Gruppe 4: Die Personen dieser Gruppe waren angeblich noch nie an einer Streptokokkeninfektion erkrankt gewesen.

Vier der insgesamt 22 Personen dieser Gruppe reagierten bereits sehr intensiv nach einer intrakutanen Injektion.

In vierzehn Fällen konnte die Impfung durchgeführt werden. Davon zeigten sieben Patienten einen deutlichen Antikörpertiter. Dies bewies, daß doch schon einmal eine typenspezifische Sensibilisierung erfolgt war.

Aus diesen Ergebnissen schlossen STOLLERMAN und Mitarbeiter, daß typenspezifische Antikörper bei denjenigen Patienten wieder auftreten können, die sich irgendwann einmal mit Streptokokken auseinandergesetzt hatten. Bei diesem Kontakt bildete der menschliche Organismus typenspezifische Antikörper. Nach einiger Zeit konnten diese wieder bis ins Unbestimmbare absinken, unabhängig von der Schwere der überstandenen Erkrankung oder der Virulenz der Erreger (LANCEFIELD). Wird einem derartig sensibilisierten Organismus 25 bis 50 µg typenspezifischer Stickstoff - bezogen auf das M-Protein der Erregermembran - injiziert, so antwortet er innerhalb von drei Wochen mit einem erneuten Titeranstieg. Dieser Befund muß als eine reine Zweitreaktion gedeutet werden, da für eine Erstreaktion die Dosis N zu gering ist. Auch die Klinik zeigt, daß selten vor Ablauf von 35 bis 60 Tagen bei einer Streptokokkenkrankung nennenswerte Antikörper nachzuweisen sind.

LANCEFIELD erklärt diese Zweitreaktion damit, daß eine Erstinfektion diejenigen Zellen, die Antikörper bilden,

so modifiziert, daß sie immer wieder typenspezifische Antikörper bilden können. Auch wenn der Titer auf eine nicht zu bestimmende Stufe abgesunken ist, zeigt sich bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger eine Sofortreaktion in Form eines Titeranstieges.

Gleiche Reaktionen fanden die Autoren auch bei Kaninchen, die vorher durch hitzegetötete Streptokokken 6 Wochen lang mit 3 Injektionen je Woche infiziert worden waren. Sie bildeten Antikörper, die innerhalb der darauffolgenden Wochen wieder auf niedrige Werte absanken. Danach stieg der Antikörpergehalt innerhalb von 5 Tagen wieder an, wenn eine einmalige Dosis von 80 μ g N gegeben wurde. Eine Wiederholung der Injektion blieb ohne zusätzlichen Einfluß auf den Titer. Bei der einmaligen Injektion war es wichtig, den Kaninchen erhöhte Dosen N zu geben, da es STOLLERMAN 3 mal mißlang, bei Gaben von 50 μ g N, wie sie maximal den Menschen gegeben wurden, eine Sekundärreaktion auszulösen.

B. Eigene Untersuchungen

Es werden nun die Erfahrungen, die mit dem Impfstoff in Tierversuch gemacht wurden, mitgeteilt, wobei immer der Blick auf eine mögliche Übertragung auf den Menschen gerichtet sein wird.

Als Versuchstiere dienten:

1. Vier Kaninchen, die mit hämolysierenden Streptokokken vom Typ 19 der Lancefieldgruppe A subkutan infiziert wurden.
2. Vier Kaninchen, die mit hämolysierenden Streptokokken vom Typ 12 der Lancefieldgruppe A subkutan infiziert wurden.
3. Vier Kaninchen, die nicht infiziert wurden.

Sie sind gleichzusetzen Menschen, die entweder bereits an einer Streptokokkeninfektion vom Typ 19 oder vom Typ 12

erkrankt waren, oder bei denen anamnestisch eine derartige Infektion nicht zu erheben war.

Der Versuchsplan sowie alle Zwischen- und Endergebnisse sind im Anhang tabellarisch und graphisch zusammengestellt.

1. Vorversuche, ASR- und Objektträgeragglutination vor der Impfung.

Von allen mit den laufenden Buchstaben A bis L bezeichneten Versuchstieren wurde durch Ohrarterienpunktion Blut gewonnen. Dieses diente zur Bestimmung der ASR und zur Untersuchung auf mögliche typenspezifische Antikörper mit Hilfe der Objektträgeragglutination.

ASR-Bestimmung:

Diese wurde freundlicherweise von Frau Dr. Eggert im Medizinischen Untersuchungsamt II in Berlin durchgeführt.

Objektträgeragglutination zur Typenbestimmung:

Da in der hiesigen Klinik gute Erfahrungen mit der Objektträgeragglutination vorlagen (Habilitationssarbeit ALEXANDER), war diese Methode auch Grundlage für die vorliegenden Versuche. Die Bestimmungsmethode ist wie folgt:

1. Es wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Kaninchenserum A bis L hergestellt. In ein erstes Röhrchen, das 1,5 ml phys. NaCl enthielt, wurden 0,1 ml Kaninchenserum gegeben und gut gemischt. In weitere Röhrchen, die 0,75 ml NaCl enthielten, wurden dann jeweils 0,75 ml der vorherigen Verdünnung einpipettiert und ebenfalls gut gemischt. Auf diese Weise entstand eine steigende Verdünnungsreihe von 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 etc..
2. Zur Bestimmung waren weiterhin 30 ml einer Keimaufschwemmung des jeweiligen Erregertyps notwendig. Diese wurden dadurch gewonnen, daß

18 bis 24 Stunden lang die typenspezifischen Streptokokken (Typ 19 und Typ 12) in Todd-Hewitt-Brühe bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Da unter dem Mikroskop eine deutliche Eigenagglutination der Streptokokken erkennbar war, wurde jede Erregeraufschwemmung zunächst durch Watte gefiltert und danach 15 Minuten lang magnetisch gerührt. Eine erneute mikroskopische Kontrolle ergab schließlich Einzelkolonien.

3. Nach den Vorbereitungen 1. und 2. wurde einem Tropfen der Bakterienaufschwemmung ein Tropfen der jeweiligen Serumverdünnung zugegeben und im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop untersucht.

2. Ergebnisse der Vorversuche.

Objektträgeragglutination:

Kaninchen A bis L zeigten gegenüber Streptokokken vom Typ 19 einen Titer von $<1:16$.

Bei Prüfung auf Erreger vom Typ 12 war der Wert bei allen Tieren $<1:16$.

ASR-Werte:

Kaninchen A, C bis G, I bis L :	25 ASE/ccm Serum
Kaninchen B :	$\pm$ 50 ASE/ccm Serum
Kaninchen H :	$\pm$ 100 ASE/ccm Serum

3. Hauptversuche.

- a) Erste Infektion mit virulenten Streptokokken und Verfahren zum Auszählen von Streptokokken.

Die Versuchstiere A bis H wurden mit 0,6 ml virulenter Streptokokken infiziert. Davon erhielten:

Kaninchen A bis D Streptokokken vom Typ 19
Kaninchen E bis H Streptokokken vom Typ 12
Kaninchen I bis L wurden nicht infiziert.

Um eine Übersicht über die injizierte Menge der Erreger zu erhalten, wurden die Keime ausgezählt. Dazu wurde die

entsprechende Streptokokkenkultur soweit verdünnt, daß zählbare Kolonien erkennbar waren. Die dann ausgezählte Zahl multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergab den gesuchten Wert.

Zu 0,1 ml einer Streptokokkenaufschwemmung wurden 9,9 ml Todd-Hewitt-Bouillon hinzugefügt. So ergab sich eine Verdünnung von 1:100. Hiervon wurden wieder 0,1 ml entnommen und mit 9,9 ml Todd-Hewitt-Bouillon auf 10 ml ergänzt. Der Verdünnungsgrad betrug somit 1:10 000. Je 1 ml dieser Aufschwemmung wurde auf 9 ml Blutagar bzw. Nährbouillon geimpft. Die Blutagarplatte sollte das Auszählen der Kolonien ermöglichen; das Bouillon-Röhrchen diente zur laufenden Verdünnung und Überimpfung.

Nach fortgesetzter Übertragung von jeweils 1 ml der vorherigen Verdünnung auf Blutagar bzw. Nährbouillon trat schließlich ein Grenzstadium ein, von dem ab Einzelkolonien in der Blutplatte erkennbar und somit auszählbar waren.

Schematisch sieht das beschriebene Auszähl-Verfahren wie folgt aus:

Versuch	Menge d. Streptokokken- aufschwemmung	Nährmedium	Verdünnung
I	0,1 ml	9,9 ml Todd-Hewitt-B.	1:100
II aus I	0,1 ml	9,9 ml Todd-Hewitt-B.	1:10.000
III a) aus II	1 ml	9,0 ml Blutagar	1:100.000
b) aus II	1 ml	9,0 ml Nährbouill.	1:100.000
IV a) aus III b)	1 ml	9,0 ml Blutagar	1:1.000.000
b) aus III b)	1 ml	9,0 ml Nährbouill.	1:1.000.000

Bei den Kulturen der Streptokokken , die den Kaninchen injiziert wurden, konnten noch bei einer Verdünnung von 1:10.000.000 40 Kolonien gezählt werden. Umgerechnet auf 1 ml Reinkultur entsprach dieser Wert 400.000.000 Kolonien.

b) Zweite bis neunte Infektion.

Die Kaninchen wurden drei Wochen lang jeden zweiten Tag mit virulenten Streptokokken infiziert. Dabei stieg die Dosis wöchentlich um 0,4 ml.

Versuchsplan:

Infekt.	Dat.	Kaninchen	Menge	Typ d. Streptokokkenkultur
2.	29.1.64	A - D	0,6 ml	19
		E - H	0,6 ml	12
3.	31.1.64	A - D	0,6 ml	19
		E - H	0,6 ml	12
4.	3.2.64	A - D	1,0 ml	19
		E - H	1,0 ml	12
5.	5.2.64	A - D	1,0 ml	19
		E - H	1,0 ml	12
6.	7.2.64	A - D	1,0 ml	19
		E - H	1,0 ml	12
7.	10.2.64	A - D	1,4 ml	19
		E - H	1,4 ml	12
8.	12.2.64	A - D	1,4 ml	19
		E - H	1,4 ml	12
9.	14.2.64	A - D	1,4 ml	19
		E - H	1,4 ml	12

Danach erfolgte die Bestimmung der Antikörper.

c) erste Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken.

Durch Punktion der Ohrarterie wurde am 17.2.1964 von allen Kaninchen Blut gewonnen und mit Hilfe der Objektträgeragglutination und der ASR der Antikörpergehalt festgestellt.

Ergebnis der Objektträgeragglutination:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ
A + D	1 : 16	19
B	< 1 : 16	19
C	1 : 32	19
A - D	< 1 : 16	12
E - H	< 1 : 16	19
F + G	1 : 16	12
E	± 1 : 16	12
H	< 1 : 16	12
I - L	< 1 : 16	19
I - L	< 1 : 16	12

Um eine Eigenagglutination der Erreger auszuschließen, wurden bei jeder Untersuchungsreihe zur Kontrolle ein Präparat mit physiologischer NaCl und ein zweites mit Normalserum mitgeführt.

ASR-Werte:

Kaninchen A, B, D - L	< 25 ASE/ccm Serum
Kaninchen C	± 25 ASE/ccm Serum

d) Zweite Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken.

Durch Punktion der Ohrarterie wurde am 21.2.64 von allen Kaninchen erneut Blut gewonnen und der Antikörpergehalt

mit Hilfe der unter c) genannten Methoden bestimmt.

Ergebnis der Objektträgeragglutinationen:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ
A, C, D	1 : 64	19
B	± 1 : 16	19
A - D	< 1 : 16	12
E - H	< 1 : 16	19
E - G	1 : 32	12
H	± 1 : 32	12
I - L	< 1 : 16	19
I - L	< 1 : 16	12

ASR-Werte:

Kaninchen A - L < 25 ASE/ccm Serum

Als Antwort auf die Streptokokkeninfektion bildeten die Kaninchen A - H Antikörper, die nur mit Hilfe der Objektträgeragglutination nachgewiesen werden konnten. Der Titer war zunächst niedrig. Innerhalb einer Woche erfolgte dann ein weiterer Anstieg.

Diese künstlich erfolgte Infektion am Kaninchen wurde im Verlauf der weiteren Betrachtungen einer Streptokokkeninfektion gleichgesetzt, wie sie beim Menschen z.B. in Form einer Angina bekannt ist, bei der als Ausdruck der Auseinandersetzung mit dem Erreger Antikörper gebildet wurden, der Postinfektionstiter dann aber wieder auf nicht mehr zu bestimmende Werte absank. Um auch im Tierversuch diese letzte Phase festzuhalten, wurde vom 24.2. bis zum 23.3.64 eine Wartezeit eingeschaltet.

e) Dritte Antikörperbestimmung nach Sensibilisierung mit virulenten Streptokokken und einer Wartezeit von 4 Wochen.

Wieder diente arterielles Blut, das am 23.3.64 allen Kaninchen entnommen wurde, zur Bestimmung der Antikörper.

Ergebnis der Objektträgeragglutinationen:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ
A - D	< 1 : 16	19
A - D	< 1 : 16	12
E - H	< 1 : 16	19
E + H	< 1 : 16	12
F, G	1 : 16	12
I - L	< 1 : 16	19
I - L	< 1 : 16	12

ASR-Werte:

Kaninchen A - G < 25 ASE/ccm Serum

Kaninchen H 50 ASE/ccm Serum

Kaninchen I - L < 25 ASE/ccm Serum

Durch die Blutkontrolle konnten nur noch bei den Kaninchen F und G Antikörper nachgewiesen werden. Der Titer von 1 : 16 ließ die bereits fallende Tendenz erkennen.

Bevor der Impfstoff aus M-Protein, das aus den Zellwänden hämolysierender Streptokokken gewonnen wurde, Verwendung finden konnte, mußten die Versuchstiere zunächst Antikörper gegen diese Erreger gebildet haben. Dabei spielten die Höhe des Titers und die Zeit, in welcher er wieder absank, keine Rolle. Eine nun folgende Injektion aus M-Protein, die mengenmäßig durch den Stickstoffgehalt N der Lösung bestimmt wurde, sollte nach den Angaben der Autoren STOLLERMAN und Mitarbeiter auch dann

innerhalb kurzer Zeit höhere Titer wieder hervorbringen, wenn vor dieser nicht einmal mehr Spuren von Antikörpern nachweisbar waren.

f) Erste Impfung und darauffolgende Antikörperbestimmung.

Datum	Maßnahmen und Beobachtungen
26.3.1964	Aus jeder Gruppe wurde ein Kaninchen ausgewählt, dem zur Kontrolle 0,5 % Phenol-NaCl injiziert wurde. Damit sollte die mögliche Annahme widerlegt werden, daß eine Impfreaktion auf das Konservierungsmittel zurückzuführen sei. Die Wahl fiel auf die Kaninchen B, E und I, die jeweils 1,6 ml 0,5 % Phenol-NaCl erhielten. Allen übrigen Kaninchen wurde 1,6 ml Impfstoff subkutan gespritzt. Da in 1ml 56 µg N. enthalten waren, entsprach dies einer Menge von 89,6 µg N.
27.3.1964	Alle Kaninchen waren wohlauf. Eine lokale Impfreaktion war nicht zu erkennen.
28.3.1964	Die Kaninchen F, I und K zeigten lokal gerötete, derbe Infiltrationen. Sonst waren die Tiere unauffällig, sie fraßen gut.
29.3.1964	Eine Rötung war nicht mehr zu erkennen. Deutlich blieben weiterhin derbe Infiltrationen.
30.3.1964	Die Infiltrationen waren unverändert, das Allgemeinbefinden der Kaninchen war gut, sie blieben ruhig und fraßen gut.
31.3.1964	Von allen Kaninchen wurde zur Antikörperbestimmung arterielles Blut gewonnen.

Ergebnis der Objektträgeragglutination nach der ersten Impfung:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ	
A	1 : 256	19	
B	< 1 : 16	19	(Kontrolltier)
C	1 : 128	19	
D	> 1 : 32	19	
A - D	< 1 : 16	12	
E	< 1 : 16	19	
F	< 1 : 16	19	
H	1 : 16	19	
G	<u>1 : 16</u>	19	
E	< 1 : 16	12	(Kontrolltier)
F	< 1 : 16	12	
G	< 1 : 16	12	
H	< 1 : 16	12	
I	< 1 : 16	19	(Kontrolltier)
J	<u>1 : 16</u>	19	
J + K	< 1 : 16	19	
I - L	< 1 : 16	12	

ASR-Werte:

Kaninchen	ASE/ccm Serum
A - D	< 25
E - G	< 25
H	< 25
I	< 25
J	50
K	± 25
L	± 50

Nach einer einmaligen Dosis M-Protein, das aus den Zellwänden hämolysierender Streptokokken vom Typ 19 der Lancefield-Gruppe A gewonnen worden war, antworteten die Kaninchen, die während der künstlichen Infektion Erreger des gleichen Typs erhalten hatten, spontan mit einem hohen Antikörper-Titer. Dieser war höher als der eigentliche Postinfektions-Titer. Bemerkenswert ist, daß ein Tier (G) aus der Gruppe der Kaninchen, die sich mit Streptokokken vom Typ 12 auseinandergesetzt hatten, und ein weiteres (J) aus der Gruppe der Kaninchen, die nicht infiziert worden waren, einen geringen Titer aufwiesen.

g) Zweite Impfung und darauffolgende Antikörperbestimmung.

Zur Kontrolle wurde noch einmal die Anfangsdosis Impfstoff injiziert. Nach einer Woche, am 7.4.1964, wurde durch Arterienpunktion erneut Blut gewonnen und untersucht.

Ergebnis der Objektträgeragglutination nach der zweiten Impfung:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ
A	1 : 256	19
B	< 1 : 16	19
C	1 : 128	19
D	1 : 32	19
A - D	< 1 : 16	12
E, F, H	< 1 : 16	19
G	<u>1 : 16</u>	19
E, H	< 1 : 16	12
F, G	< 1 : 16	12
I, K, L	< 1 : 16	19
J	<u>1 : 16</u>	19
I - L	< 1 : 16	12

ASR-Werte:

Kaninchen	ASE/ccm Serum
A, C - I	< 25
B, J	50
K	$\pm$ 25
L	$\pm$ 50

Nach der erneuten N-Injektion bezogen auf M-Protein war ein weiterer Titeranstieg nicht zu verzeichnen.

Am Ende der Versuchsreihen stand die Aufgabe, auch die bisher nicht durch Streptokokken sensibilisierten Kaninchen mit dem vorliegenden Impfstoff aktiv zu immunisieren.

h) Weitere Impfungen, auch der nicht infizierten Versuchstiere.

Datum	Maßnahmen und Beobachtungen
-------	-----------------------------

7.4.1964 Es erhielten:

Kanin. I	2,2 ml	0,5 % Phenol-NaCl	(Kontrolltier)
Kanin. J	2,2 ml	Impfstoff = 107 μ g N	
Kanin. K	2,2 ml	Impfstoff = 107 μ g N	
Kanin. L	2,2 ml	Impfstoff = 107 μ g N	

Es bildeten sich keine Rötung und Schwellung;
die Tiere fraßen gut.

14.4.1964 Es erhielten:

Kanin. I	2,8 ml	0,5 % Phenol-NaCl	(Kontrolltier)
Kanin. J	2,8 ml	Impfstoff = 137,2 μ g N	
Kanin. K	2,8 ml	Impfstoff = 137,2 μ g N	
Kanin. L	2,8 ml	Impfstoff = 137,2 μ g N	

Weiterhin gute Verträglichkeit des Impfstoffes;
die Tiere fraßen gut.

21.4.1964 Es erhielten:

Kanin. I	3,4 ml	0,5 % Phenol-NaCl	(Kontrolltier)
Kanin. L	3,4 ml	Impfstoff = 166,6 μ g N	
Kanin. K	3,4 ml	Impfstoff = 166,6 μ g N	
Kanin. L	3,4 ml	Impfstoff = 166,6 μ g N	

Datum	Beobachtungen
22.4.1964	Lokale Rötung und Schwellung bei allen Tieren erkennbar.
23.4.1964	Derbe Infiltration von 2 cm Durchmesser im Bereich der Injektionsstelle bei allen Tieren.
24.4.1964	Nur noch ein erbsengroßes, leicht verschiebbares Knötchen erkennbar. Tiere ruhig und fressen gut.
27.4.1964	Knötchen von der Größe eines Stecknadelkopfes. Tiere sind wohllauf und sehr ruhig.
	Von den Kaninchen I - L wurde arterielles Blut gewonnen und die Antikörper bestimmt.

Ergebnis der Objektträgeragglutination nach den Impfungen der zuvor nicht infizierten Versuchstiere:

Kaninchen	Antikörper-Titer	gegenüber Streptokokken-Typ
I	< 1 : 16	19 (Kontrolltier)
J	1 : 128	19
K	> 1 : 16	19
L	1 : 64	19
I - L	< 1 : 16	12

ASR-Werte:

Kaninchen	ASE/ccm Serum
I	< 25 (Kontrolltier)
J	50
K	± 25
L	± 50

Nach der aktiven Immunisierung, die sich über 5 Wochen erstreckte, wenn die beiden Testinjektionen vom 23.3.1964 und vom 31.3.1964 berücksichtigt werden, waren Antikörper allein durch die Objektträgeragglutination nachweisbar.

V. Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse.

Kaninchen wurden durch steigende Dosen lebender Streptokokken vom Typ 19 und Typ 12 der Lancefield-Gruppe A sensibilisiert. Es fiel auf, daß die Zahl der Keime, die beim Menschen schwere pathologische Erscheinungen hervorgerufen hätte, am Tier keine sichtbare Reaktion auslöste; die Antikörperbildung war gering. Weiter trat eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Keimen des gleichen Typs hervor. Bildeten in einer Gruppe aus 4 Tieren noch 3 Tiere Antikörper von 1 : 64, so fiel ein viertes mit dem Wert von 1 : 16 heraus. Dieses Kaninchen wurde im weiteren Verlauf als Kontrolltier ausgewählt.

Eine Erklärung für die Reaktionsträgheit, die unterschiedliche Sensibilisierung, d.h. Antikörperbildung gegen Keime vom Typ 19 und Typ 12, mag darin zu finden sein, daß die Virulenz und damit der M-Proteingehalt der Keime beider Typen durch die wiederholte Todd-Hewitt-Bouillon-Passage abgenommen hatte. Dabei zeichnet sich Typ 19 gegenüber Typ 12 noch durch einen höheren M-Proteingehalt aus. Damit können auch die niedrigen N-Werte - bezogen auf M-Protein - erklärt werden, die bei der Impfstoffgewinnung bestimmt wurden, doch spielte hier sicher auch die Methode eine wichtige Rolle.

Die Tiere bildeten Antikörper, die aber bereits nach 4 Wochen nicht mehr oder gerade noch nachweisbar waren. Deutlich war im weiteren Verlauf die Reaktion der Kaninchen auf die erste Injektion des M_{19} -Proteins, das durch mechanische Eröffnung der Streptokokken und nachfolgender mehrfacher Phosphatpufferwäsche gewonnen wurde. Die injizierte Menge wurde nach dem Stickstoffgehalt (N) bestimmt.

Da schon die Autoren POTTER, STOLLERMAN und SIEGEL beschrieben hatten, daß Mengen von 50 μg , wie sie dem Menschen gegeben wurden, beim Kaninchen keine Reaktion auslösten, wurden im

vorliegenden Tierversuch 89,6 μg N injiziert. Aus der Gruppe der Kaninchen, die durch steigende Dosen hämolyzierender Streptokokken vom Typ 19 sensibilisiert worden waren, waren bei zwei Tieren Antikörper von 1:256 und von 1:128 nachweisbar, die damit deutlich höher waren als die Postinfektionstiter. Das dritte Tier bildete auch Antikörper, der Titer entsprach dem Wert nach erfolgter erster Sensibilisierung. Der Titer des Kontrolltieres blieb $< 1:16$. Beachtenswert ist, daß aus den Gruppen der Kaninchen, die entweder durch Streptokokken vom Typ 12 oder nicht sensibilisiert worden waren, jeweils ein Tier herausfiel, das ebenfalls nach M_{19} Injektion Antikörper bildete. Der Titer betrug 1:16 und änderte sich nach erneuter Injektion nicht. Daraus könnte geschlossen werden:

1. Jegliche Antikörperbildung bis 1:16 ist unspezifisch, oder
2. Die fraglichen Tiere hatten doch schon einmal Kontakt mit Streptokokken vom Typ 19 und als Boosterreaktion traten erneut Antikörper auf.

Nach aktiver Immunisierung der vorher nicht infizierten Kaninchen durch insgesamt 5 N_{19} -Injektionen steigender Konzentration waren Antikörper nachweisbar. Die Werte waren 1 : 128, 1:64 und 1:16 und somit höher als die, die nach Sensibilisierung mit lebenden Streptokokken bestimmt worden waren. Die Kontrolltiere, die 0,5 % Phenolkochsallösung erhalten hatten, reagierten nicht.

Zum Vergleich wurde bei jeder Antikörperbestimmung auch die ASR bestimmt. Sie ergab vor und nach erfolgter Sensibilisierung keinerlei pathologische Befunde. Einheiten von < 25 waren die Regel.

Bedeutsamer war sie für die nicht infizierten Kaninchen, da spontan nach einer einzigen N-Injektion eine ASR-Erhöhung zu erkennen war, die sich auch bei erneuter, zweiter

Injektion nicht änderte. Die Werte waren zwar nicht pathologisch, jedoch bemerkenswert, da die Typ 19- und Typ 12-infizierten Kaninchen keine Reaktion zeigten.

Die ASR erwies sich im Tierversuch, in dem eine akute oder überstandene Streptokokkeninfektion nachzuweisen war, als unzulänglich. Gleiches Verhalten zeigte sich auch beim Menschen, bei Patienten, die nachweislich einen Scharlach oder eine Endocarditis (s. Tabellen im Anhang) durchgemacht hatten und bei denen durch Kulturverfahren die Streptokokkenätiologie auch nachgewiesen wurde. Mit der angegebenen Methode gelingt es, auch in den Fällen mit negativer ASR die Streptokokkenätiologie noch nach längerer Zeit nachzuweisen. Durch geringe N-Gaben, bezogen auf das Antigen-M, trat als Boosterreaktion eine spontane Antikörpererhöhung ein. Diese Reaktion ist äußerst empfindlich. Leider hat die Methode einen großen Nachteil, sie ist streng typenspezifisch, d.h. Typ 19-Antikörpererhöhung wird durch M_{19} erreicht. So müßte also in fraglichen Fällen gegen 50 Sero-Typen der Gruppe A getestet werden.

VI Zusammenfassung der Arbeit.

Es wird über die tierexperimentelle Erprobung einer neuen Methode zum Nachweis einer vor längerer Zeit stattgefundenen Streptokokkeninfektion berichtet. Das Verfahren beruht darauf, daß durch subkutane Injektionen eines Streptokokkenimpfstoffes ein Boostereffekt ausgelöst wird und Antikörper gegen lange zurückliegende Streptokokkeninfektionen im Serum ansteigen.

Der Antikörpernachweis erfolgt mit Hilfe der Objektträgeragglutination. Die Reaktion ist empfindlicher als die Antistreptolysinreaktion. Ihr Wert wird aber dadurch ein-

geschränkt, daß sie typenspezifisch ist und keine Kreuzreaktionen auftreten.

Um zum Beispiel bei einem Herzvitium oder einer chronischen Glomerulonephritis die Streptokokkenätiologie zu klären, müßte die Reaktion mit Impfstoffen aller 50 Streptokokken der Serogruppe A durchgeführt werden.

VII. Literaturverzeichnis

- 1) ALEXANDER, M. Klinische Beobachtungen, Therapie und bakteriologische Untersuchungen bei Streptokokkeninfektionen, insbesondere bei Scharlach und Angina. Habilitationsschrift, 1963, FU Berlin
- Teilveröffentlichungen:
- 1a) ALEXANDER, M. Typenbestimmungen bei Streptokokken der Serogruppe A und ihre Beziehungen zu Nierenkomplikationen bei Streptokokkeninfekten. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, 69. Kongreß, 1963
- 1b) ALEXANDER, M. Klinische Beobachtungen, Therapie und bakteriologische Untersuchungen bei Streptokokkeninfektionen, insbesondere bei Scharlach und Angina. Fortschritte der Medizin, 81 (1963) S.929
- 2) BARKULIS, S.S.u. Studies of streptococcal cell-walls.
M.F.JONES I. Isolation, chemical composition and preparation of M-protein.
J.of Bac. 74(1957)S.207
- 2a) BARKULIS, S.S., Studies of streptococcal cell-walls.
J.WALSH und II. Type-specific antigenicity in rabbits.
R.D.ECKSTEDT J.of Bac. 76(1958)S.209
- 3) BOLTAX, A.J. und Serologic tests for inflammation, serum complement, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in myocardial infarction.
E.E.FISCHEL Am.J.Med. 20(1956)S.20
- 4) BURTIN, P. Étude immunoelectrophorétique de la C-reactive protein. Sem.Hôp.Paris 33 (1957)S.2177
- 5) McCARTY, M. Nature of rheumatic fever.
Circulation 14(1956)S.1138

- 6) McCARTY.M. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. J.Exp.Med. 85(1947)S.491
- 7) McCARTY,M.und Variation in the group specific carbo-
R.LANCEFIELD hydrate of group A streptococci.
J.Exp.Med.102(1955)S.11
- 8) CATANZARO,F.J., The role of streptococcus in the patho-
CH.A.STETSON, genesis of rheumatic fever.
A.J.MORRIS, Ann.J.Med.17(1954)S.749
R.CHAMOVITZ,
B.L.STOLZER und
W.D.PERRY
- 9) COBORN,A.F.und Studies of the relationship of streptococcus
R.H.PAULI to the rheumatic process.
II.Observations on the immunological responsis
of rheumatic subjects to hemolytic strep-
toccus. J.Exp.Med.56(1932)S.651
- 10) ECKSTEDT,H.und Factors affecting the chain length of
G.H.STOLLERMAN group A streptococci.
J.Exp.Med.112(1960)S.687
- 11) ELSTER,S.K., A study of C-reactive protein in the serum
E.BRAUNWALD,und of patients with congestive heart failure.
H.F.WOOD Am.Heart J. 51(1956)S.533
- 12) GALTS,J. Bedeutung der ASR für die innere Medizin
cit. in G.NEUHAUS, siehe 20)
- 13) HARTMANN,F. Serologische Reaktionen beim Rheumatismus.
Z.f.Rheumaforschung 16(1957)S.150
- 14) KONZONIS,M.C.u. The value of the C-reactive protein-de-
J.GUREVIN termination in coronary artery disease.
Ann.Inter.Med.46(1957)S.79
- 15) KROOP,I.J.und The C-reactive protein determination asan
N.H.SHACKMAN index of myocardical necrosis in coronary
artery disease. Ann.J.Med.22(1957)S.90

- 16) LANCEFIELD, R. Persistence of typespecific antibodies in man following infection with group A streptococci. J.Exp.Med. 110(1959)S.27
- 17) LONGCOPE, W.T. Studies in the variation in the anti-streptolysintitre in the bloodserum from patients with hemotrophic nephritis. J.Clin.Investig. 15(1930)S.269
- 18) MERKENSCHLAGER, M. Zellhomogenisator der Fa. Braun.
K.SCHLOSSMANN u. Biochem.Zeitschrift 332(1957)
W.KURZ
- 19) MICKLE, H. II.-Tissue Disintegrator.
J.of Royal Mic.Society, LXVIII Serie III (1948)
p.10
- 20) NEUHAUS, G. Klinische Untersuchungen nach Herzoperationen unter besonderer Berücksichtigung des Postcommissurotomiesyndroms.
Habil.-Schrift FU Berlin 1959, nicht publ.
- 21) OKER-BLOM, N. Experiences on the antistreptolysin reaction.
Ann.Med.Exp.Biol.Fenniae 25(1957)S.29
- 22) OKER-BLOM, N. Meanerror in antistreptolysin determination.
Ann.Med.Exp.Biol.Fenniae 28(1950)S.107
- 23) POTTER, E.V., Recall of typespecific antibodies in man
G.H.STOLLERMAN u. by injections of streptococcal cell-walls.
A.SIEGEL J.Clin.Investig. 41(1962)S.301
- 24) ROTHBARD, S., Bacteriologic and immunologic studies on
R.F.WATSON, patients with hemolytic streptococcic in-
H.F.SWIFT und fections as related to rheumatic fever.
A.T.WILSON Arch.Int.Med. 82(1948)S.229
- 25) SALTON, M.R.J.u. Studies of the bact.cell-wall.
R.W.HORNE II.Methods of preparation and some pro-
perties of cell-walls.
Biochemica et Biophysica 7(1951)S.177

- 26) SASLAW, M. S. u. M. M. STREITFELD Group A beta hemolytic streptococci in relation to rheumatic fever (Study of school-children in Miami, Florida) Amer. J. Dis. Child. 92 (1956) S. 550
- 27) SCHMIDT, H. ASR und CRP bei Streptokokkeninfektionen Med. Klinik 8 (1959) S. 296
- 28) SCHMIDT, W. C. Group A streptococcal polysaccharide. Studies in its preparation, chemical composition and cellular localisation after intravenous injection into mice. J. Exp. Med. 95 (1952) S. 15
- 29) STOLLERMAN, G. H. u. R. EKSTEDT Long chain formation by strains of group A streptococci in presence of homologous antiserum: A-type specific reaction. J. Exp. Med. 106 (1957) S. 345
- 30) STOLLERMAN, G. H., A. SIEGEL und E. E. JOHNSON Evaluation of the "long chain reaction" as a means for detecting typespecific antibody to group A streptococci in human sera. J. Exp. Med. 110 (1959) S. 887
- 31) STOLLERMAN, G. H., F. S. KANTOR u. B. D. GORDON Accessory plasma factors involved in the bactericidal-test for typespecific antibody to group A streptococci. I. A typical behavior of some human and rabbits blood. J. Exp. Med. 108 (1958) S. 475
- 32) STOLLERMAN, G. H. Thermolabile factors in human plasma that provoke phagocytosis of virulent group A streptococci. Trans. Ass. Am. Physicians 74 (1961) S. 225
- 33) SWIFT, H. F. The etiology of rheumatic fever. Ann. Int. Med. 31 (1949) S. 715
- 34) SWIFT, H. F., A. T. WILSON und R. LANCEFIELD Typing group A hemolytic streptococci by M-precipitin reactions in capillary pipettes. J. Exp. Med. 78 (1943) S. 127

- 35) SWIFT, H.F. und
B.E.HODGE Type specific anti-M-precipitins in
rheumatic and non rheumatic patients
with hemolytic streptococcal infections.
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.34(1936)S.849
- 36) TARAN, L.M.,
J.M.JABLON und
H.N.WEYR Immunologic studies in rheumatic fever
cutaneous response to type-specific
proteins of hemolytic streptococcus
response to combinations of "M" proteins
from selected types of hemolytic strep-
tococci. J.Immunol.49(1944)S.209
- 37) TODD, E.W. Antigenic streptococcal hemolysin.
J.Exp.Med.55(1932)S.267
- 38) TODD, E.W. Antihemolysintiters in hemolytic strep-
tococcal infection and their significance
in rheumatic fever.
Brit.J.Exp.Path.13(1937)S.248
- 39) WAGNER, O. und
E.JANSSON C-reactive protein in serous meningitis
and paralytic poliomyelitis. Annales
Medicinae Experimentalis et Biologiae
Fenniae, 35(1957)S.352
- 40) ZACH, J. Zur quantitativen Bestimmung des C-reak-
tiven Proteins. Klin.W.schr.35(1957)S.936

Tabelle 1: Versuchsprotokoll für Versuchstiere A bis D (Typ 19 - infizierte Kaninchen)
Graphische Darstellung der Ergebnisse s. Bild 1

Nummer	391	400	389	385
Bezeichnung	A	B	C	D
Aufende Nummer	1	2	3	4
Agglutination (OA) vor Infekt.	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16
Blut vom 27.1.64	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
Zeit: 10.00 - 10.20				
SR vor Infektion	< 25	+ 50	< 25	< 25
SR Blut s.o.				
Infektion	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Zeit: 10.00 - 10.20				
Infektion	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Zeit: 9.00 - 9.10				
Infektion	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Zeit: 10.00 - 10.20				
Infektion	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
Zeit: 9.00 - 9.10				
Infektion	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
Zeit: 11.00 - 11.10				
Infektion	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
Zeit: 13.10 - 13.20				
Infektion	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
Zeit: 11.00 - 11.10				
Infektion	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
Zeit: 9.10 - 9.20				
Infektion	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
Zeit: 9.00 - 9.10				
A art. Blut entnommen am 17.2.64	Typ 19: 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: 1 : 32	Typ 19: 1 : 16
Zeit: 11.00 - 11.20	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
SR Blut s.o.	< 25	< 25	± 25	< 25
A art. Blut entnommen am 21.2.64	Typ 19: 1 : 64	Typ 19: 1 : 16	Typ 19: 1 : 64	Typ 19: 1 : 64
Zeit: 9.00 - 9.20	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
SR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
Wartezeit:	24.2.1964	-	23.3.1964	
A bestimmt am 3.3.64 art. Blut	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: < 1 : 16
Zeit: 9.00 - 9.20	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
SR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
Impfung	1,6 ml Impfstoff (I.St.)=89,6µg N	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl (Kontrolltier)	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
Zeit: 10.30 - 10.50				
A art. Blut	Typ 19: 1 : 256	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: 1 : 128	Typ 19: 1 : 32
Zeit: 10.30 - 10.40	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
SR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
Impfung	1,6 ml I.St. = 89,6 µg N	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
Zeit: 10.30 - 10.50				
A bestimmt am 4.3.64	Typ 19: 1 : 256	Typ 19: < 1 : 16	Typ 19: 1 : 128	Typ 19: 1 : 32
Zeit: 11.00 - 11.20	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16	Typ 12: < 1 : 16
SR Blut s.o.	< 25	50	< 25	< 25

Ende der Versuchsreihe: 7.4.1964

Tabelle 2: Versuchsprotokoll für Versuchstiere E bis H (Typ 12 - infizierte Kaninchen)
Graphische Darstellung der Ergebnisse s. Bild 2

Nummer	397	380	386	378
Bezeichnung	E	F	G	H
laufende Nummer	5	6	7	8
Objektträger-Agglutination (OA) vor Infektion art. Blut vom 27.1.64 Zeit: 10.20 - 10.40	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR vor Infektion Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	± 100
1. Infektion 27.1.64 Zeit: 10.20 - 10.40	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
2. Infektion 29.1.64 Zeit: 9.10 - 9.20	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
3. Infektion 31.1.64 Zeit: 10.10 - 10.20	0,6 ml lebender Streptokokken	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
4. Infektion 3.2.64 Zeit: 9.30 - 9.40	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
5. Infektion 5.2.64 Zeit: 11.10 - 11.20	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
6. Infektion 7.2.64	1 ml lebender Streptokokken	1 ml	1 ml	1 ml
7. Infektion 10.2.64 Zeit: 11.10 - 11.20	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
8. Infektion 12.2.64 Zeit: 9.20 - 9.30	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
9. Infektion 14.2.64 Zeit: 9.10 - 9.20	1,4 ml lebender Streptokokken	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
OA art. Blut vom 17.2.64 Zeit: 11.20 - 11.50	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: ± 1 : 16	< 1 : 16 1 : 16	< 1 : 16 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
OA art. Blut vom 21.2.64 Zeit: 9.20 - 9.45	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: 1 : 32	< 1 : 16 1 : 32	< 1 : 16 1 : 32	< 1 : 16 ± 1 : 32
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
Wartezeit: 24.2.1964 - 23.3.1964				
OA art. Blut vom 23.3.64 Zeit: 9.20 - 9.40	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 1 : 16	< 1 : 16 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	50
1. Impfung 26.3.64 Zeit: 10.40 - 10.50	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl (Kontrolltier)	1,6 ml Impfstoff (I.St.) = 89,6 µg N	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
OA art. Blut vom 31.3.64 Zeit: 10.50 - 11.20	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
2. Impfung 31.3.64 Zeit: 10.50 - 11.20	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl (Kontrolltier)	1,6 ml I.St. = 89,6 µg N	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
OA art. Blut vom 7.4.64 Zeit: 11.20 - 11.40	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25

Ende der Versuchsreihe: 7.4.1964

Tabelle 3: Versuchsprotokoll für Versuchstiere I bis L
(nicht infizierte, später durchgeimpfte Kaninchen)
Graphische Darstellung der Ergebnisse s. Bild 3

Nummer	390	382	383	381
Bezeichnung	I	J	K	L
laufende Nummer	9	10	11	12
Objektträger-Agglutination (OA) vom 27.1.64 Zeit: 10.40 - 11.05	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25

1. Wartezeit: 27.1.64 - 17.2.64

OA art. Blut vom 17.2.64 Zeit: 11.50 - 12.15	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	< 25	< 25	< 25
OA art. Blut vom 21.2.64 Zeit: 9.45 - 10.10	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR art. Blut vom 21.2.64 Zeit: 9.45 - 10.10	< 25	< 25	< 25	< 25

2. Wartezeit: 24.2.64 - 23.3.64

OA art. Blut vom 23.3.64 Zeit: 9.40 - 10.00	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
1. Impfung 26.3.64 Zeit: 10.50 - 11.00	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl (Kontrolltier)	1,6 ml Impfstoff (I.St.) = 89,6 µg N	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
OA art. Blut vom 31.3.64 Zeit: 11.10 - 11.30	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	<u>1 : 16</u> < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	50	± 25	± 50
2. Impfung 31.3.64 Zeit: 11.10 - 11.30	1,6 ml 0,5% Phenol NaCl	1,6 ml I.St. = 89,6 µg N	1,6 ml I.St.	1,6 ml I.St.
OA art. Blut vom 7.4.64 Zeit: 11.40 - 12.00	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	<u>1 : 16</u> < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16	< 1 : 16 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	50	± 25	± 50
3. Impfung 7.4.64 Zeit: 10.00 - 10.10	2,2 ml 0,5% Phenol NaCl	2,2 ml I.St. = 107,8 µg N	2,2 ml I. St.	2,2 ml I.St.
4. Impfung 14.4.64 Zeit: 10.35 - 10.45	2,8 ml 0,5% Phenol NaCl	2,8 ml I.St. = 137,2 µg N	2,8 ml I.St.	2,8 ml I.St.
5. Impfung 21.4.64 Zeit: 12.50 - 13.00	3,4 ml 0,5% Phenol NaCl	3,4 ml I.St. = 166,6 µg N	3,4 ml I.St.	3,4 ml I.St.
OA art. Blut vom 28.4.64 Zeit: 10.00 - 10.20	Typ 19: < 1 : 16 Typ 12: < 1 : 16	1 : 128 < 1 : 16	> 1 : 16 < 1 : 16	1 : 64 < 1 : 16
ASR Blut s.o.	< 25	50	± 25	± 50

Ende der Versuchsreihe: 28.4.1964

Behandlung	durchgeführte	ASR-Anstiege bzw. hohe Titer	
	ASR	Anzahl	%
<i>symptomatisch</i>	150	90	60,0
<i>Penicillin, früh</i>	119	65	54,6
<i>Penicillin, spät</i>	292	180	61,6
<i>insgesamt</i>	561	335	<u>59,7</u>

Tabelle 4: ASR-Werte nachgewiesener Scharlachfälle

	+		Ø	
	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>ASR</i>	21	42	31	58
<i>CRP</i>	11	22	41	78

	erhöht		normal	
	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>BSR</i>	20	38	80	62

Tabelle 5: ASR-Werte bei nachgewiesenen rheumatischen Endokarditiden (Mitralstenosen)

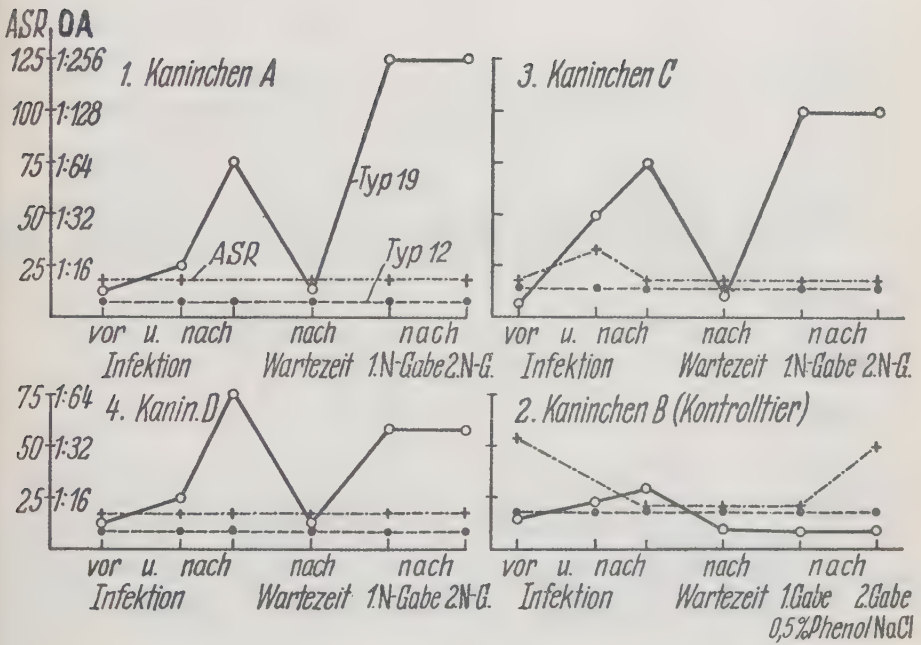


Bild 1: ASR-Werte und Objektträger-Agglutinationen (OA)
in Abhängigkeit von der Versuchszeit;
Versuchstiere A bis D (Typ 19 - infizierte Tiere)

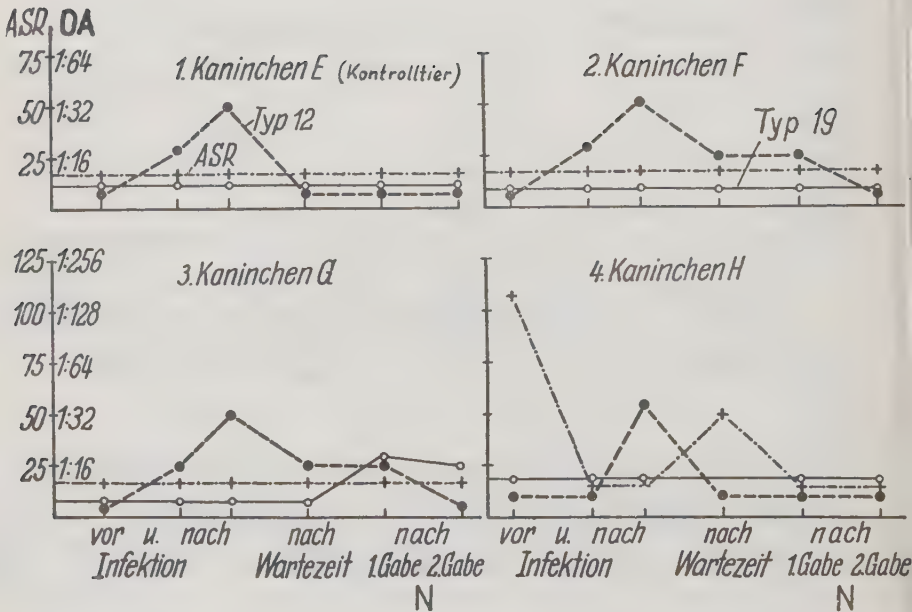


Bild 2: ASR-Werte und Objektträger-Agglutinationen (AO) in Abhängigkeit von der Versuchszeit; Versuchstiere E bis H (Typ 12 - infizierte Tiere)

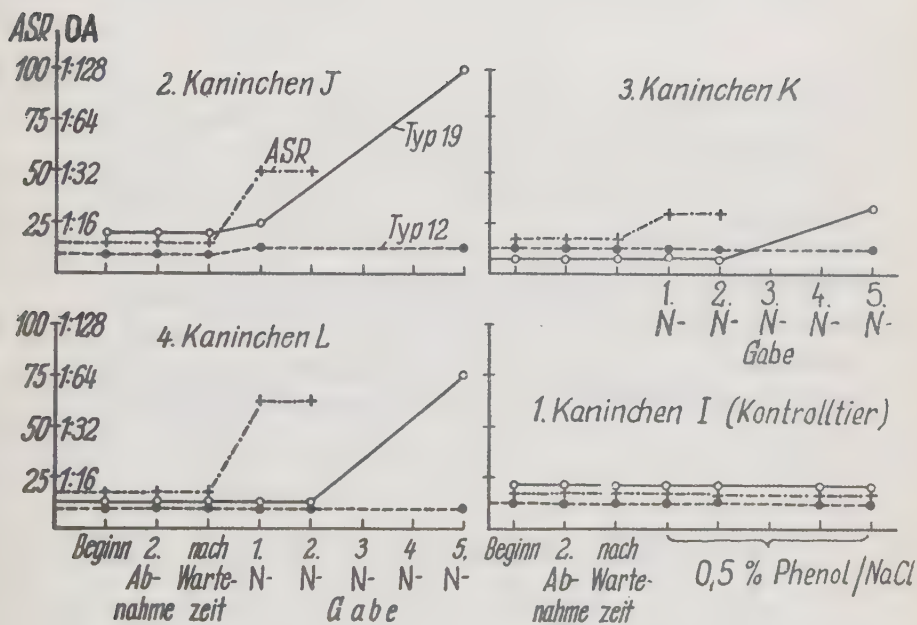


Bild 3: ASR-Werte und Objektträger-Agglutinationen (OA) in Abhängigkeit von der Versuchszeit; Versuchstiere I bis L (nicht infizierte, nach Ablauf der Wartezeit geimpfte Tiere)

Frau Priv. Doz. Dr.med. M. Alexander danke ich für die Überlassung des Themas und für ihre fördernden Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Des weiteren danke ich dem Direktor beim Bundesgesundheitsamt, Herrn Prof. Dr.phil. Hermann, sowie Herrn wiss. Rat Dr.med. Stöß† für ihre Beratung und Unterstützung bei der Herstellung des Impfstoffes.

Lebenslauf

Rotraut Kirschling geb. Maassen

29. 1.1940 Geboren in Jena als zweite Tochter des Arztes Dr. med. Willy Maassen und seiner Ehefrau Ruth geb. Seifert
- Ostern 1946 Einschulung in die Grundschule in Neumünster
- Frühjahr 1949 Übersiedelung nach Kiel, dort Besuch der Volksschule
- Ostern 1952 Umschulung nach Eignungsprüfung in die 7. Klasse der Mittelschule
- Herbst 1952 Einstufung in die Quarta der Oberschule
- Frühjahr 1957 Übersiedelung nach Berlin, Besuch der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung des wissenschaftlichen Zweiges der Oberschule
4. 3.1960 Reifeprüfung an der Sophie Scholl-Schule in Berlin-Schöneberg
- SS 1960 Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
18. 4.1961 Vorphysikum mit Prädikat "gut" bestanden
- 15.10.1962 Physikum mit Prädikat "sehr gut" bestanden
- WS 1962 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Karl Franzens Universität in Graz
- WS 1963 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
23. 4.1966 Ärztliches Staatsexamen mit Prädikat "sehr gut" bestanden
29. 4.1966 Eheschließung mit Dr.-Ing. Günter K.W. Kirschling
1. 6.1966 Beginn der Tätigkeit als Medizinalassistentin

